

部分循環式連続フリーフロー等電点電気泳動法による多成分タンパク質の同時連続分離に関する研究

著者	金 成 勲
号	2493
発行年	1999
URL	http://hdl.handle.net/10097/7766

氏 名	Kim Seong Hoon 金 成 勲
授 与 学 位	博士（工学）
学位授与年月日	平成 12 年 3 月 23 日
学位授与の根拠法規	学位規則第 4 条第 1 項
研究科、専門の名称	東北大学大学院工学研究科（博士課程）化学工学専攻
学位論文題名	部分循環式連続フリーフロー等電点電気泳動法による多成分タンパク質の同時連続分離に関する研究
指 導 教 官	東北大学教授 米本 年邦
論文審査委員	主審 東北大学教授 米本 年邦 東北大学教授 鈴木 睦 東北大学教授 寶澤 光紀

論 文 内 容 要 旨

バイオテクノロジーにより生産される医薬品や食品などの生化学物質は、人間に摂取されることが多いため、極めて高純度であることが要求される。そのため、生化学物質の生産プロセスでは、バイオリアクターなどを用いて生産された粗原料から目的成分となる生化学物質を分離・精製するダウンストリームプロセッシングが重要となる。特に、生化学物質は、温度や pH などの環境の変化によって変性しやすく、物理的・化学的性質が類似した類縁物質と混在している。従って、ダウンストリームプロセッシングでは、穏和な操作条件下で多成分混合物から目的物質のみを取り出す高度な選択性を有する分離・精製プロセス操作が必要となる。等電点電気泳動法は、生化学物質毎に固有の値を示す等電点に基づいて分離を行う手法であり、電場を形成させるだけという穏和な条件下での操作が可能であることから、生化学物質の分離に適しているといえる。これまで分取規模の等電点電気泳動装置の開発に関する研究は盛んに行われてきたが、主に二成分混合物分離に及ぼす装置性能や各種操作因子の影響が検討されているにすぎない。そのため、実際の分離・精製プロセスで必要不可欠となる多成分混合物から目的成分を取り出す技術は未だ確立していないのが現状である。多成分混合物を等電点で分類すると、目的成分、目的成分より低い等電点を持つ不純物グループ、高い等電点を持つ不純物グループの三つに分けられる。従って、多成分混合物から目的成分を分離・回収するためには、少なくとも三成分混合物から目的成分を分離・回収する技術が必要となる。

本研究では、多成分混合物分離の基礎となる三成分タンパク質の同時連続分離を行うための部分循環式連続フリーフロー等電点電気泳動法を用いた新規な分離法を構築すると共に、実験と理論の両面からこの手法の解析を行うことを目的とする。

第 1 章 緒論

電気泳動装置を生化学物質の分離・精製プロセスで利用するためには、スケールアップした分取規模装置の開発が必要となる。本章では、電気泳動法を分類し、分取規模装置の開発に適したゾーンおよび等電点電気泳動法の分離原理を述べた。また、これまでに開発された両手法に関する装置の問題点を指摘し、本研究の目的を述べた。

第2章 短絡循環流路を設置した部分循環式連続フリーフロー等電点電気泳動法による三成分タンパク質の同時連続分離

著者の所属する研究室では既に、原料供給・製品回収部を備えた部分循環式連続フリーフロー等電点電気泳動装置を開発して二成分タンパク質の連続分離を行っており、97%以上の純度で各タンパク質を連続的に分離・回収できることを報告している。しかし、実際の実験・精製プロセスで重要となる多成分混合物の連続分離にこの装置を適用するためには、何らかの装置の工夫が必要となる。本章では、多成分分離の基礎となる三成分タンパク質の同時連続分離を行うために、短絡循環流路を設置した新規な部分循環式連続フリーフロー等電点電気泳動法を提案し、試作装置を用いて実際に連続分離実験を行った。分離モデルタンパク質として牛血清アルブミン(BSA; $pI=5.1$)、牛血液ヘモグロビン(Hb; $pI=6.9$)およびリボヌクレアーゼA(RNase; $pI=9.5$)の混合物を取り上げた。この場合、目的成分は中間の等電点を持つHbとなる。本装置は、電圧を印加して分離を行う泳動装置と試料溶液や製品溶液の連続的な供給や回収を行う20本の外部リザーバーから構成されている。本手法による分離原理は、緩衝剤を用いて陰極で低く陽極で高いpH勾配を形成させた泳動室内に混合物試料を供給し、周囲のpHに基づき各物質を正あるいは負に荷電させて自己の等電点方向に泳動させ分離するというものである。しかし、泳動方向は二方向であるため、三成分混合物分離の場合、目的成分と同じ方向に泳動する不純物成分が必ず存在し、これらを泳動度の違いによって分離しなければならず、目的成分中に泳動方向の同じ成分の混入が生じるという問題点がある。本装置の特徴は、この不純物成分の混入を防ぐために、低pH領域の溶液を引き抜き直接高pH領域に供給するための短絡循環流路を設置した点である。この流路によって低pH領域では同じ泳動方向を持つ目的成分と不純物成分を高pH領域に移動させると、より低い等電点を持つ目的成分の泳動方向のみが逆転するため、両者を分離することができる。所望のpH勾配を形成させる緩衝剤には、アミノ酸であるシクロセリン(cyc-ser; $pI=5.9$)、ヒスチジン(his; $pI=7.6$)、カルノシン(car; $pI=8.1$)を用いた。

比較のために、短絡循環流路を設置しない装置を用いて三成分タンパク質の連続分離実験を行った。その結果、短絡循環流路を設置した場合に各タンパク質の製品純度が高くなったことから、本装置が三成分混合物の同時連続分離に有効であることが分った。また、本装置における分離挙動に及ぼす各種操作因子の影響を検討したところ、目的成分の製品純度を高めるためには、分離の駆動力である印加電圧を高くすることや循環流量を大きくすることが有効であることが分った。ただし、循環流量は大きくしすぎると対流の影響により若干の分離能の低下を引き起こすため、目的成分の純度に極大値を与える条件が存在し、本実験では、印加電圧900 V、原料供給・製品回収流量0.6 cm³/min、循環流量5.4 cm³/minの条件下で、Hb製品純度が最も高い0.801を得ることができた。

第3章 短絡循環流路を設置した部分循環式連続フリーフロー等電点電気泳動法に関する2次元数学モデルの構築

等電点電気泳動法による分離プロセスでは、泳動室内での緩衝剤や分離物質が解離反応を起こし種々のイオンの形で存在しており、各物質はそれぞれ周囲のpHに強く依存した電位勾配による泳動、濃度勾配による拡散、液流れによる対流といった移動現象に支配されている。そのため、本分離プロセスは非線形性が強い多変数システムであり、その移動現象は非常に複雑である。これまでに提案された本分離プロセスに関する数学モデルは、主に、特定の化学種に関する解離反応のみを考慮するなどの簡略化した1次元モデルであるため、緩衝剤の選択や適用系に限界があった。本章では、第2章で提案した分離法に関して電場および液流れ方向の2次元数学モデルを構築した。本モデルでは、系内に存

在する水、緩衝剤として用いた三種のアミノ酸、支持電解質、および三種のタンパク質に関する全ての解離化学種計18種を考慮しており、導出した基礎式は、泳動室内の非定常物質収支式と電荷収支式、リザーバーでの非定常物質収支式からなる。本モデルでは、泳動室内の物質移動として、電場方向に関しては電位勾配による泳動、濃度勾配による拡散、原料供給・製品回収によって生じる対流、短絡循環流路によって生じる対流を、液流れ方向に関しては循環操作によって生じる対流をそれぞれ考慮し、各方向の物質流束をNernst-Planck式を用いて表した。そして、本モデルの未知定数である各化学種の解離定数や拡散係数などの物性値に既往の文献値や推算式による値を用いて第2章の分離実験に関するシミュレーションを行った。その結果、各製品回収リザーバーのタンパク質の経時変化や操作終了後のタンパク質濃度分布およびpH分布に関する計算値と実験値が概ね一致したことから、本2次元モデルの有効性を確認することができた。

また、本モデルは実験で測定することができない泳動室内のpH勾配の経時変化や各タンパク質の濃度分布、電位勾配などの有用な知見を与えることができるとともに、分離に及ぼす各種操作因子の影響を表現することができるため、分離挙動の解明に非常に有効であることが分った。

第4章 原料供給チャンネルから目的成分を回収する部分循環式連続フリーフロー等電点電気泳動法による三成分タンパク質の同時連続分離

第2章で提案した短絡循環流路を設置した手法では、短絡循環流路によって生じる対流の影響により目的成分純度に極大値を与える条件が存在し、目的成分を完全分離することができなかった。本章では、さらに目的成分の製品純度を高めるために、等電点電気泳動法にゾーン電気泳動法の特徴である一パスを組み合わせることににより、原料供給チャンネルから目的成分を回収する新規な部分循環式連続フリーフロー等電点電気泳動法を提案した。本手法による分離原理は、緩衝剤を用いて陰極で低く陽極で高いpH勾配を形成させた泳動室内に原料である混合物試料を供給し、原料中の目的成分を荷電せずに同じチャンネルに保持させたまま流出させ、他の不純物成分を正あるいは負に荷電させて自己の等電点方向に泳動させ分離するというものである。本手法は、一定のpH下で一パス分離を行う従来のゾーン電気泳動法に比べて、pH勾配下で等電点の差を利用して一パス分離を行うため、原料溶液に加える緩衝剤のpHが目的成分の等電点に等しいことが要求される。そこで、第3章で構築した2次元数学モデルを拡張することにより本分離法に関するモデルを構築し、このモデルを用いて原料溶液のpHが目的成分の等電点と等しくなるための条件を探索した。その結果、シクロセリンとカルノシンを1 mol/m³づつ混合して用いた場合に、目的成分であるHbの等電点と等しいpHを得ることが分った。

実際にこの条件下で連続分離実験を行ったところ、前述した短絡循環流路を設置した手法では、目的成分の製品純度は最大でも0.8程度であったのに対し、本手法を用いた場合では1となり、全てのタンパク質を完全分離することができた。また、本手法は前述した短絡循環流路を設置した手法よりも高い原料供給流量で運転した場合でも良好な分離結果が得られることから、処理量の面でも優れていると考えられる。しかし、本手法では、前述したように原料溶液に加える緩衝剤のpHが目的成分の等電点と等しいことが必要不可欠であり、緩衝剤として用いられるアミノ酸の種類および等電点は限られているため、この条件を満たす緩衝剤を選択できるかどうか問題となる。従って、場合に応じて両分離法を選択する必要があると考えられる。

第5章 総括

前章までの内容を各章毎にまとめ、本論文を総括した。

審査結果の要旨

生化学物質の生産プロセスでは、バイオリアクターなどを用いて生産された粗原料から目的成分となる生化学物質を分離・精製するダウンストリームプロセッシングが重要となる。等電点電気泳動法は、生化学物質毎に固有の値を示す等電点に基づいて分離を行う手法であり、電場を形成させるだけという穏和な条件下での操作が可能であることから、温度や pH などの環境の変化によって変性しやすい生化学物質の分離に適しているといえる。これまで分取規模の等電点電気泳動装置の開発に関する研究は盛んに行われてきたが、主に二成分混合物分離に及ぼす装置性能や各種操作因子の影響が検討されているにすぎず、実際の分離・精製プロセスで必要不可欠となる多成分混合物から目的成分を取り出す技術は未だ確立していない。

著者は、多成分混合物分離の基礎となる三成分タンパク質の同時連続分離を行うための部分循環式連続フリーフロー等電点電気泳動法を用いた新規な分離法を構築すると共に、実験と理論の両面からこの手法の解析を行った。本論文はこれらの成果をまとめたもので、全編5章からなる。

第1章は諸論であり、研究の背景および目的を述べている。

第2章では、短絡循環流路を設置した新規な部分循環式連続フリーフロー等電点電気泳動法を提案し、試作装置を用いて三成分タンパク質の同時連続分離実験を行い、本手法の有効性を検討している。本分離法の特徴である短絡循環流路は、三成分分離で起こる目的成分中への泳動方向の等しい不純物成分の混入を防ぐために、低 pH 領域の溶液を引き抜き直接高 pH 領域に供給するというものであり、流路出入口の pH の違いを利用して目的成分の泳動方向を逆転させることにより、混入不純物との分離を実現している。

第3章では、第2章で提案した分離法に関する電場および液流れ方向2次元数学モデルを構築している。本モデルは、系内に存在する全ての解離化学種を考慮した上で導出した泳動室およびリザーバーでの非定常物質収支式と電荷収支式からなる。モデル定数に文献値を用いて行ったシミュレーション結果は、第2章で得られた各製品回収リザーバーのタンパク質濃度の経時変化やリザーバーでのタンパク質濃度および pH 分布を概ね表現した。また本モデルは、実測不可能な泳動室内部の pH や濃度分布など有用な知見を与えると共に、分離に及ぼす各種操作因子の影響を表現した。

第4章では、目的成分純度のさらなる向上を目指して、等電点電気泳動法にゾーン電気泳動法の特徴である一パスを組み合わせることで、原料供給チャンネルから目的成分を回収する新規な部分循環式連続フリーフロー等電点電気泳動法を提案し、その有効性を検討している。本手法では、全てのタンパク質を純度 100%で分離することができた。本法では、原料溶液に加える緩衝剤の pH が目的成分の等電点と等しいことが要求されるが、この条件を満たす緩衝剤を選択できれば極めて有効な分離法となろう。

第5章は総括である。

以上要するに本論文は、三成分タンパク質の同時連続分離を行うための二つの新規な分離法を開発し、各分離法に関する2次元数学モデルを構築することによって分離挙動を明らかにしたものであり、化学工学ならびに生物分離工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。